

PCT/JP 00/01415

08.03.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP 00/01415

REC'D 28 APR 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 9 年 3 月 8 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 0 6 0 9 0 4 号

出 願 人

Applicant (s):

昭和産業株式会社

④

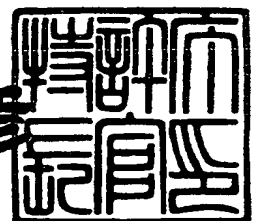
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 0 年 4 月 1 4 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 2 5 7 5 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 P199S02001

【提出日】 平成11年 3月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市桜1丁目16番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内

    【氏名】 井上 靖

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市桜1丁目16番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内

    【氏名】 山本 良重

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市桜1丁目16番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内

    【氏名】 大島 良恵

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市桜1丁目16番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内

    【氏名】 安武 望

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市桜1丁目16番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内

    【氏名】 三吉 新介

【特許出願人】

    【識別番号】 000187079

    【氏名又は名称】 昭和産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100104673

【弁理士】

【氏名又は名称】 南條 博道

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050740

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 微生物寄託書 2

【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プロモーター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 バチルス属に属する微生物に由来する  $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターであって、その 3' 末端近傍に制限酵素切断部位が 1 又は 2 以上導入され、かつ、そのプロモーター活性が天然のプロモーター配列の活性よりも高い、プロモーター。

【請求項 2】 前記  $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターが、バチルス・アミロリクファシエンスに由来する、請求項 1 に記載のプロモーター。

【請求項 3】 前記制限酵素切断部位が B a m H I である、請求項 1 または 2 に記載のプロモーター。

【請求項 4】 前記プロモーターが配列番号 1 に記載の配列を有する、請求項 3 に記載のプロモーター。

【請求項 5】 前記制限酵素切断部位が、B a m H I と B a m H I 以外の 1 又は 2 以上の制限酵素切断部位であり、該 B a m H I 切断部位が 3' 末端側にある、請求項 1 または 2 に記載のプロモーター。

【請求項 6】 前記制限酵素切断部位が、B a m H I と E c o R I との制限酵素切断部位を有し、該 B a m H I と E c o R I 切断部位との間に 1 又は 2 以上の制限酵素切断部位を有してもよい、請求項 5 に記載のプロモーター。

【請求項 7】 前記プロモーターの配列が配列番号 2 の配列であり、前記制限酵素切断部位が 5' 末端側から順に、B a m H I、S m a I、K p n I、S a c I および E c o R I の制限酵素切断部位である、請求項 6 に記載のプロモーター。

【請求項 8】 請求項 1 ないし 7 いずれかの項に記載のプロモーターを有する発現カセット。

【請求項 9】 請求項 8 の発現カセットの制限酵素切断部位にタンパク質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクター。

【請求項 10】 前記タンパク質をコードする配列が菌体内酵素の配列である、請求項 9 に記載の発現ベクター。

【請求項 11】 前記タンパク質をコードする配列がホスホリラーゼの配列である、請求項 9 または 10 に記載の発現ベクター。

【請求項 12】 前記ホスホリラーゼがトレハロースホスホリラーゼまたはマルトースホスホリラーゼである、請求項 11 に記載の発現ベクター。

【請求項 13】 請求項 9 ないし 12 のいずれかの項に記載の発現ベクターを有する組換え微生物。

【請求項 14】 請求項 13 に記載の組換え微生物を培養する工程を含む、タンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プロモーターに関する。さらに詳しくは、プロモーターの下流の 3' 末端に制限酵素切断部位を有し、かつ、プロモーター活性が向上した、新規なプロモーターに関する。

【0002】

【従来の技術】

微生物による物質生産の手段として、目的の蛋白質をコードする遺伝子をベクターに組み込み、得られた組換えベクターを細胞に導入して、この遺伝子を発現させ、目的の蛋白質を宿主微生物中に生産させることが広く行われている。この遺伝子の発現に関する領域の一つにプロモーターがある。

【0003】

プロモーターは、RNAポリメラーゼが認識し結合する領域である -35 および -10 領域を含む領域と、RNAポリメラーゼにより合成された mRNA とリボソームとの結合を指定する領域とを含んでいる。プロモーター領域の塩基配列は、発現効率に関して、極めて重要であるのみならず、その塩基配列間の距離すなわち塩基数も重要である (Mol.gen.Genet. 186 339-(1982))。

【0004】

プロモーターの配列及び塩基配列に関する研究は、まず、大腸菌のプロモーターで行われ、大量発現のためのプロモーターも作成されており、大腸菌を宿主と

する物質生産が行われている。

【0005】

しかし、大腸菌はパイロジェンを生産するため、蛋白生産において、精製に多大なコストが必要となる。従って、医薬品、食品等の分野には適していないため、他の微生物等の宿主細胞が望まれている。その中でも、バチルス属の微生物は、醗酵生産に用いられてきた経験があること、分泌性が高いこと、及び、病原性がなく発熱物質を生産しないこと等の理由から、宿主細胞として有望視されている。

【0006】

バチルス属の微生物を宿主とする蛋白質の生産に関する報告は多数あるが、ほとんどの場合、分泌を目的として、分泌シグナル配列に目的の蛋白質をコードする遺伝子をインフレームで接続する点に主眼が置かれており（例えば、特開昭59-205996号公報、特開昭62-215393号公報、特開平3-206889号公報、特公平6-69377号公報、特開平7-155183号公報等）、プロモーター活性を高くする試みはほとんど行われていない。

【0007】

バチルス属のプロモーターの改良に関して、特表平6-500689号公報にはバシラス・サチルスと $\alpha$ アミラーゼのハイブリッドプロモーターが記載され、特表平7-504085号公報には、バシラス・リヘニフォルミスの $\alpha$ アミラーゼ遺伝子の553番目と588番目から595番目までに9個の変異を有するプロモーターが、天然の配列に比べて活性が高いことが記載されているが、まだ十分に活性が高いとはいえない。

【0008】

このように、バチルス属のプロモーターの改良に関する研究成果がほとんど報告されていないのは、研究が成されていないのではなく、ほとんど成果が上がらないからと考えられ、これが、バチルス属の微生物の組換え宿主としての利用を妨げている一つの原因とも考えられる。

【0009】

従って、特に、医薬品あるいは食品の分野において、バチルス属の微生物のプ

ロモーターの発現効率を高め、宿主としての利用価値を高めることが望まれているのが現状である。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明は、バチルス属微生物の高活性のプロモーターを提供し、バチルス属の宿主としての利用を高めることを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決すべく、バチルス・アミロリクファシエンス由来  $\alpha$  アミラーゼプロモーター領域の3' 末端近傍に位置するDNA配列に変異を加えることによってプロモーター活性が向上することを見出して、本発明を完成させた。

【0012】

すなわち、本発明は、バチルス属に属する微生物に由来する $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターであって、その3' 末端に制限酵素切断部位が1又は2以上導入され、かつ、そのプロモーター活性が天然のプロモーター配列の活性よりも高い、プロモーターに関する。

【0013】

好ましい実施態様においては、本発明の $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターは、バチルス・アミロリクファシエンスに由来する。

【0014】

また、好ましい実施態様においては、本発明のプロモーターは、3' 末端に制限酵素切断部位BamHIを有している。

【0015】

さらに、好ましい実施態様においては、本発明のプロモーターは、配列番号1に記載の配列を有する。

【0016】

また、好ましい実施態様では、前記制限酵素切断部位が、BamHIとBamHI以外の1又は2以上の制限酵素切断部位であり、該BamHI切断部位が3

’ 末端側にある。

【0017】

さらに好ましい態様では、前記制限酵素切断部位が、B a m H I と E c o R I との制限酵素切断部位を有し、該 B a m H I と E c o R I 切断部位との間に 1 又は 2 以上の制限酵素切断部位を有してもよい。

【0018】

また、好ましい実施態様においては、本発明のプロモーターは、配列番号 2 の配列を有し、5’ 末端側から順に、B a m H I、S m a I、K p n I、S a c I および E c o R I の制限酵素切断部位を有する。

【0019】

さらに、本発明は、上記プロモーターを有する発現カセットに関する。

【0020】

そして、本発明は、この発現カセットの制限酵素切断部位にタンパク質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターに関する。

【0021】

好ましい態様においては、前記タンパク質をコードする配列が菌体内酵素の配列である。

【0022】

より好ましい実施態様においては、この発現ベクターのタンパク質をコードする配列がホスホリラーゼの配列である。

【0023】

より好ましい実施態様においては、このホスホリラーゼがトレハロースホスホリラーゼまたはマルトースホスホリラーゼである。

【0024】

本発明は、さらに、上記発現ベクターを有する組換え微生物に関する。

【0025】

【発明の実施の形態】

(プロモーター)

本発明のプロモーターは、バチルス属に属する微生物に由来する  $\alpha$ -アミラー



ゼのプロモーターを改変したものである。バチルス属に属する微生物としては、バチルス・アミロリクファシエンス、バチルス・サチルス、バチルス・リヘニホルミス、バチルス・ポリミクサ、バチルス・ステアロサーモフィラス、バチルス・セルオプロテオリチクス、バチルス・コアギュランス、バチルス・スリンジエンス、バチルス・メガテリウム、バチルス・セレウス、バチルス・ナット、バチルス・アシドカアルダリウス等が挙げられる。中でも、バチルス・アミロリクファシエンスに由来する $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターが発現効率の点から好ましい。

## 【0026】

本発明の $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターは、3'末端近傍に制限酵素切断部位が1又は2以上導入されている。ここで3'末端の近傍とは、3'末端から数えて約10bpをいう。制限酵素切断部位の種類には、特に制限がなく、BamHI、SmaI、KpnI、SacI、EcoRI、HindIII、PstI等が挙げられる。1つの制限酵素部位の場合、BamHIが好ましい。複数の制限酵素切断部位を有する場合も、BamHIを3'末端側に有し、他の制限酵素部位を5'末端側に有することが好ましい。この場合、他の制限酵素部位としては、EcoRIが好ましく、BamHIとEcoRIとの制限酵素切断部位の間に1又は2以上の制限酵素切断部位、例えば、SmaI、KpnI、SacIを有してもよい。もちろん、EcoRIの5'側の下流に、さらに別の制限酵素切断部位、例えば、HindIII、PstI等を有することができる。

## 【0027】

本発明のプロモーターが後述の発現カセットあるいは発現ベクターに用いられる場合、複数の制限酵素部位は、マルチクローニングサイトとして用いられる。すなわち、外来遺伝子の組み込みが容易になるように、複数の制限酵素切断部位を設けることができる。マルチクローニングサイトに用いるベクターの制限酵素切断部位を考慮して決定すれば良い。

## 【0028】

本発明のプロモーターの好ましい配列は、配列番号1に記載の配列である。この配列は、3'末端にBamHIを有している。2以上の制限酵素切断部位（す

なわち、マルチクローニングサイト)を有する場合の好ましい配列は、配列番号 2 の配列である。この配列番号 2 の配列の 3' 末端側には、BamHI、SmaI、KpnI、SacI および EcoRI の制限酵素切断部位が、この順で配置されている。

【0029】

本発明のプロモーターは、バチルス属の微生物に由来する  $\alpha$  アミラーゼのプロモーター領域の 3' 末端に制限酵素切断部位を導入することにより得られる。制限酵素切断部位の導入には、適切な遺伝子組換え方法が用いられる。例えば、DNA の合成、制限酵素切断部位配列を導入したプライマーを用いる PCR などの方法が適用される。PCR 法が、プロモーターの単離と制限酵素部位の導入の両方を同時にできるので、好ましい。PCR のプライマーは、例えば、Gene 1543-(1981)に記載されたバチルス・アミロリクファシエンス由来の  $\alpha$  アミラーゼのプロモーター配列を基にして作製でき、3' 側のプライマーの配列に制限酵素切断部位配列を導入すればよい。配列番号 4、配列番号 5 の配列が制限酵素切断部位配列を導入するためのプライマーの例である。

【0030】

(発現カセット)

本発明において、発現カセットとは、発現を意図する目的遺伝子の組み込み部位を 1 又は 2 以上有し、その目的遺伝子が組み込まれたときに発現できるようなベクターまたはプラスミドをいう。本発明のプロモーター領域は、その 3' 末端に目的遺伝子の組み込み部位となる制限酵素切断部位を有しているので、適切なベクターまたはプラスミドの適切な部位に、本発明のプロモーターを導入することにより、発現カセットが構築される。

【0031】

発現カセット作製に用いられるベクターとしては、宿主菌株中で自己複製が可能であり、且つ、プロモーター配列、目的蛋白質をコードする構造遺伝子を安定に保持できるものであれば、いかなるものでも使用できる。このベクターは、宿主への導入確認のために、選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン／ネオマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子）を有することが好

ましい。また、適切なターミネーター、エンハンサーなどの発現調節配列を連結  
 されているもよい。

【 0 0 3 2 】

発現カセットの作成に用いられるバチルス属のベクターとしては、枯草菌で複製可能な p U B 1 1 0 (Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 1423-(1978))、p C 1 9 4、p T 1 2 7 (Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 1680-(1977)) またはこれらの誘導体などが挙げられる。

【 0 0 3 3 】

その他、発現カセットの作製に用いられるベクターの例としては、大腸菌及び枯草菌で複製可能なシャトルベクター p H Y 3 0 0 P L K (Jpn. J. Genet., 60 235-(1985))、更に大腸菌で複製可能な p B R 3 2 2 (Gene, 2, 95-(1977)) や p U C 1 9 (Messing, Methods. Enzymol., 101, 20-(1983)) などが挙げられる。

【 0 0 3 4 】

特に、シャトルベクターは、遺伝子の増幅などの点で有用である。

【 0 0 3 5 】

(発現ベクター)

本発明においては、発現ベクターとは、上記発現カセットの制限酵素切断部位に目的蛋白質をコードする構造遺伝子が組み込まれたベクターまたはプラスミドをいう。組み込まれる遺伝子は、導入される宿主で発現されるものであれば、どのようなものでもよい。例えば、ホスホリラーゼ (トレハロースホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ、コージピオースホスホリラーゼなど) の遺伝子が挙げられる。特に、バチルス属に由来する遺伝子として、例えば、バチルス・ステアロサーモフィラス S K - 1 株 (通産省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターへ寄託、FERM P - 1 4 5 6 7) 由来トレハロースホスホリラーゼ (以降、T P a s e と略す)、バチルス・スピーシーズ R K - 1 株 (通産省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターへ寄託、FERM P - 1 5 0 4 4) 由来マルトースホスホリラーゼ (以降、M P a s e と略す) などを用いることができる。連結される外来遺伝子はそれにコードされている遺伝子産物の発現を目的とすることに限定されず、アンチセンス

RNAによる発現制御もその目的に含まれる。

【0036】

なお、目的蛋白質をコードする遺伝子は、分泌に関与する、いわゆるリーダー配列を含んでいてもよいし、含んでいなくてもよい。前者の場合、目的蛋白質は宿主細胞外に分泌され、後者の場合、宿主細胞内に蓄積される。

【0037】

目的蛋白質をコードする構造遺伝子の発現カセットへの組み込みは、当業者が用いる適切な方法で行われる。本発明のプロモーターの制限酵素切断部位と、その導入すべき遺伝子の3'末端および5'末端の配列が一致すれば、その制限酵素切断部位に導入することができる。一致しない場合は、制限酵素切断部位の配列を、導入すべき遺伝子の配列と適合させるか、導入すべき遺伝子の末端の配列を変えればよい。配列を変える方法としては、PCR、部位特異的突然変異などの方法が挙げられる。

【0038】

以上の組換えDNA技術は、例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) を参照して行うことができる。

【0039】

(組換え微生物および目的蛋白質の製造方法)

得られた発現ベクターは、ついで、宿主微生物に導入される。宿主微生物としては、特に制限はないが、例えば、大腸菌の場合には、DH5 $\alpha$ 株、HB101株、C600株、JM101株等が挙げられる。また、バチルス属宿主の場合にはバチルス・サチルス BD170株、168株、ISW1214株などが挙げられる。プロモーターがバチルス属に属する微生物に由来することから、バチルス属の微生物がもっとも好ましい。

【0040】

宿主微生物への発現ベクターの導入方法は問わない。例えば、形質転換、形質導入、細胞融合、エレクトロポレーションなどの方法が挙げられる。例えば、大腸菌宿主の場合、MandelとHigaの方法(J.Mol.Biol., 53, 159-(1970))、Hanahanの方法(J.Mol.Biol., 166, 557-(1983))等が使用できる。また、バチルス属の微

生物の場合にはコンピテントセル法 (Mol.Gen.Genet.,167, 251-(1979)) やプロトプラスト法 (Mol.Gen.Genet.,168,111-(1978)) 等を持ちいることができる。

【0041】

導入後、選択マーカーで組換え微生物を取得し、得られた組換え微生物を培養することにより、目的の蛋白質が培地中に分泌され、もしくは微生物細胞内に蓄積されるので、常法により、目的蛋白質を回収すれば良い。

【0042】

なお、本発明のプロモーター活性と天然のプロモーター配列の活性との比較は、プロモーター下流に組み込んだ外来遺伝子の発現量を測定することにより、行われる。

【0043】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0044】

(実施例 1 : 本発明のプロモーターの取得および発現カセットの作製)

図 1 に、本発明のプロモーターの取得および発現カセットの作製の模式図を示す。バチルス・アミロリクファシエンス I F O 1 5 5 3 5 を培養し、常法により染色体 DNA を回収した。Gene, 15, 43- (1981) に記載の  $\alpha$  アミラーゼプロモーター配列をもとに、配列表の配列番号 3 および配列番号 4 の配列を有する 2 種類のプライマーを合成し、PCR 法により増幅した。なお、PCR は、耐熱性ポリメラーゼとして、AmpliTaq Gold (パーキンエルマー社製) を使い、Gene Amp PCR System 9700 (パーキンエルマー社製) を使用して、製造者の指針に従って、行った。

【0045】

PCR で増幅した遺伝子断片を制限酵素 X b a I と B a m H I とで切断した後、3.0% アガロース電気泳動に供し、 $\alpha$  アミラーゼのプロモーター領域を含む 0.25 k b p の X b a I - B a m H I 断片をアガロースゲルより回収した。得られた断片の配列を決定したところ、もとの  $\alpha$  アミラーゼ遺伝子のプロモーター

配列の、3'末端から3番目と2番目の配列が、AAからTCへと変化しており、BamHI切断部位が導入されていた。

【0046】

他方で、プラスミドpUB110 (SIGMA社製) をXbaI-BamHIで消化後、得られたプロモーター配列 (0.25 kbp XbaI-BamHI断片) を、T4リガーゼを用いて連結し、発現カセットpUB-PBを得た (図1)。

【0047】

(実施例2: 本発明のプロモーターの取得および発現カセットの作製)

配列番号4の代わりに、配列番号5に示す配列のライマーを用いた以外は、実施例1と同じ操作を行うことにより、配列番号1の下流にSmaI、KpnI、SacI、EcoRIの制限酵素切断部位が導入された0.27 kbp XbaI-EcoRI DNA断片を、XbaIとEcoRIとで切断したプラスミドpUB110に導入し、発現カセットpUB-PBEを得た。この発現カセットpUB-PBE作成の模式図を図2に示す。

【0048】

(実施例3: MPase発現ベクターの作製)

MPaseの遺伝子は、特開平10-262683号の記載に基づき、バチルス・スピーシーズRK-1株 (FERM P-15044) の染色体から取得した。すなわち、配列表の配列番号6及び配列番号7に示す2種類のプライマーを用いて、PCR法により遺伝子を増幅し、制限酵素BamHI-EcoRIで切断し、0.8%アガロース電気泳動で2.4 kbp BamHI-EcoRI断片を回収した。この断片には、MPaseの構造遺伝子が含まれていた。

【0049】

他方で、プラスミドpUB-PBをBamHI-EcoRIで消化後、MPase構造遺伝子を含む2.4 kbp断片を、T4リガーゼを用いて連結し、プラスミドpUB-PB-MPを得た。MPase発現ベクターの構築を図3に示す。

【0050】

さらに、プラスミドpUB-PBEをBamHI-EcoRIで消化後、上記

操作で増幅したMPase構造遺伝子を含む2.4kb p断片を、T4リガーゼを用いて連結し、プラスミドpUB-PBE-MPを得た。MPase発現ベクターの構築を図4に示す。

## 【0051】

(実施例4：TPase発現ベクターの作製)

TPaseの遺伝子は、特開平10-327887号の記載に基づき、バチルス・ステアロサーモフィラスSK-1株(FERM P-14567)の染色体から取得した。すなわち、配列表の配列番号8及び配列番号9に示す2種類のプライマーを用いて、PCR法により遺伝子を増幅し、制限酵素BamHI-EcoRIで切断し、0.8%アガロース電気泳動で2.4kb p BamHI-EcoRI断片を回収した。この断片には、TPaseの構造遺伝子が含まれていた。

## 【0052】

他方で、プラスミドpUB-PBをBamHI-EcoRIで消化後、TPase構造遺伝子を含む2.4kb p断片を、T4リガーゼを用いて連結し、プラスミドpUB-PB-TPを得た。TPase発現ベクターの構築を図5に示す。

## 【0053】

また、プラスミドpUB-PBEをBamHI-EcoRIで消化後、上記操作によって増幅したTPase構造遺伝子を含む2.4kb p断片を、T4リガーゼを用いて連結し、プラスミドpUB-PBE-TPを得た。TPase発現ベクターの構築を図6に示す。

## 【0054】

(比較例1：野生型の $\alpha$ アミラーゼプロモーターを有するMPase発現ベクターの作製)

実施例1で得られたバチルス・アミロリクファシエンスIFO 15535の染色体DNAを用い、配列番号3及び配列番号10に示す2種類のプライマーを用いて、PCR法により増幅した。得られた断片を、T4DNAキナーゼを用いてリン酸化した後、klenow酵素を利用して平滑末端化した。その後、XbaIで消化し、3.0%アガロース電気泳動に供し、DNA断片を回収した。

この操作によって、5'末端にXbaI切断部位を有し、3'末端が平滑化された0.25kbpの野生型の $\alpha$ アミラーゼプロモーター断片が得られた。

【0055】

また、バチルス・スピーシーズRK-1株(FERM P-15044)の染色体から、配列表の配列番号11及び配列番号7に示す2種類のプライマーを用いて、PCR法により遺伝子を増幅した。得られた断片を、T4DNAキナーゼを用いてリン酸化した後、klenow平滑末端化処理を行なった。その後、EcoRIで切断し、0.8%アガロース電気泳動に供し、DNA断片を回収した。この操作によって5'末端が平滑で、3'末端にEcoRI切断部位を有する2.4kbpのMPase遺伝子を得た。

【0056】

他方で、プラスミドpUB110を制限酵素XbaI-EcoRIで消化後、先に得たプロモーターの0.25kbp DNA断片およびMPaseの、2.4kbpの断片をライゲーションさせた。その結果、発現ベクターpUB-P-MPが得られた。発現ベクターpUB-P-MPの構築の模式図を図7に示した。

【0057】

(比較例2：野生型の $\alpha$ アミラーゼプロモーターを有するTPase発現ベクターの作製)

実施例3のバチルス・ステアロサーモフィラスSK-1株(FERM P-14567)の染色体から、配列表の配列番号12及び配列番号9に示す2種類のプライマーを用いて、PCR法により遺伝子を増幅した。得られた断片を、T4DNAキナーゼを用いてリン酸化した後、klenow平滑末端化処理を行なった。その後、EcoRIで切断し、0.8%アガロース電気泳動に供し、TPase構造遺伝子領域を含む2.4kbp断片を回収した。この操作によって5'末端が平滑で、3'末端にEcoRI切断部位を有するTPase遺伝子を得た。

【0058】

他方で、プラスミドpUB110を制限酵素XbaI-EcoRIで消化後、比較例1と同様にして、TPaseの発現ベクターpUB-P-TPを得た。



## 【0059】

(実施例5:MPase及びTPase活性の比較)

(枯草菌への形質転換と発現)

実施例3及び4並びに比較例1及び2で得られた発現ベクターを用いて、常法により、バチルス・サブチリス168株を形質転換して、以下の組換え枯草菌*B. subtilis*/pUB-PB-MP、*B. subtilis*/pUB-PBE-MP、*B. subtilis*/pUB-PB-TP、*B. subtilis*/pUB-PBE-TP、*B. subtilis*/pUB-P-MP、及び*B. subtilis*/pUB-P-TPを得た。前4者は制限酵素部位がプロモーターに導入された発現ベクターを有し、後2者は、天然型のプロモーターを有する発現ベクターを有する。

## 【0060】

得られた組換え枯草菌株を、100mlのL培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、pH7.2、10 $\mu$ gカナマイシン)に植菌し、37℃で一晩培養した。培養液1mlを採取し、遠心分離による集菌と、0.85%NaCl水溶液への懸濁を繰り返し、洗菌した。次に、0.85%NaCl水溶液に懸濁した菌を100mlの2 $\times$ YT培地(1.6%トリプトン、1.0%酵母エキス、0.5%NaCl、pH7.2、100 $\mu$ Mカナマイシン)を有する500ml容のひだ付き三角フラスコに植菌し、ロータリーシェーカーを用いて20時間培養した。培養終了後、培養液を超音波処理して菌体を破壊し、遠心分離にて菌体残渣を除去して粗酵素液を調製し、そのMPaseまたはTPaseの活性を測定した。結果を表1に示す。

## 【0061】

【表1】

株	MPase活性
<i>B. subtilis</i> /pUB-PB-MP	240,000U/l
<i>B. subtilis</i> /pUB-PBE-MP	240,000U/l
<i>B. subtilis</i> /pUB-P-MP	50,000U/l

株	TPase活性
<i>B. subtilis</i> /pUB-PB-TP	300,000U/l
<i>B. subtilis</i> /pUB-PBE-TP	300,000U/l
<i>B. subtilis</i> /pUB-P-TP	70,000U/l

【0062】

MPase、及びTPaseとも、3'末端に制限酵素切断部位を有する $\alpha$ アミラーゼプロモーターを用いることによって、生産性を向上することができた。

【0063】

なお、MPase及びTPaseの活性測定は、以下の方法によった。

【0064】

(MPaseの活性測定)

粗酵素液0.4ml、0.5Mリン酸クエン酸緩衝液(pH6.0)0.06ml、2W/V%マルトース0.6ml、及び蒸留水0.14mlを混合し、60℃、15分間マルトース分解反応を行った。反応後10分間の煮沸によって反応を停止させ、この反応停止液から0.02mlを採取し、グルコース検査試薬グルコースCII-テストワコー(和光純薬工業(株))を3ml加え、室温で20分間反応させた後、505nmでの吸光度を分光光度計を用いて測定し、反応液中のグルコース量を定量した。生成したグルコースの量から1分間に1 $\mu$ molのトレハロースを加リン酸分解した酵素量を1単位とした。

【0065】

(TPaseの活性測定)

基質を2W/V%トレハロースとした以外は、MPaseと同様にして、反応液中のグルコース量を定量し、1分間に1 $\mu$ molのトレハロースを加リン酸分解した酵素量を1単位とした。

【0066】

【発明の効果】

$\alpha$ アミラーゼプロモーターの3'末端に制限酵素切断部位を導入することによって、プロモーター活性を向上させる。物質生産に有用である。

【0067】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Showa Sangyo Co., Ltd.

<120> Promoter

<130> P199S01001

<160> 12

<210> 1

<211> 249

<212> DNA

<213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<400> 1

```

gccccgcaca tacgaaaaga ctggctgaaa acattgagcc tttgatgact gatgatttgg 60
ctgaagaagt ggatcgattg tttgagaaaa gaagaagacc ataaaaatac cttgtctgtc 120
atcagacagg gtatatttta tgctgtccag actgtccgct gtgtaaaaaa taggaataaa 180
gggggggttgt tattatttta ctgatatgta aaatataatt tgtataagaa aatgagaggg 240
agaggatcc                                     249
    
```

<210> 2

<211> 270

<212> DNA

<213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<400> 2

```

gccccgcaca tacgaaaaga ctggctgaaa acattgagcc tttgatgact gatgatttgg 60
ctgaagaagt ggatcgattg tttgagaaaa gaagaagacc ataaaaatac cttgtctgtc 120
atcagacagg gtatatttta tgctgtccag actgtccgct gtgtaaaaaa taggaataaa 180
gggggggttgt tattatttta ctgatatgta aaatataatt tgtataagaa aatgagaggg 240
agaggatcc cgggtaccga gctcgaattc                                     270
    
```

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial

<400> 3

```

cgctctagag ccccgcacat acgaaaaga                                     29
    
```

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial

<400> 4

cgcgatcct ctccctctca ttttcttat

29

<210> 5

<211> 50

<212> DNA

<213> artificial

<400> 5

cgcgaattcg agctcggtac ccgggatcc tctccctctc atttcttat

50

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial

<400> 6

cgcgatcca tgtattacaa caggttggt

29

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial

<400> 7

cgcgaattct cacacatact ccttcgtat

29

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial

<400> 8

cgcgatcca tgtcttggtc aattagctc

29

<210> 9	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> artificial	
<400> 9	
aaagaattct cgtcgcgctt ccaccgatt	29
<210> 10	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> artificial	
<400> 10	
gtttcctctc cctctcattt tcttat	26
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial	
<400> 11	
atgtattaca acaggttggt	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial	
<400> 12	
atgtcttggt caattagctc	20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明のプロモーターの取得および発現カセットの作製を示す模式図である。

【図 2】

本発明の発現カセット p U B - P B E 作成の模式図である。

【図 3】

本発明の発現ベクター  $pUB-PB-MP$  作製の模式図である。

【図 4】

本発明の発現ベクター  $pUB-PBE-MP$  作製の模式図である。

【図 5】

本発明の発現ベクター  $pUB-PB-TP$  作製の模式図である。

【図 6】

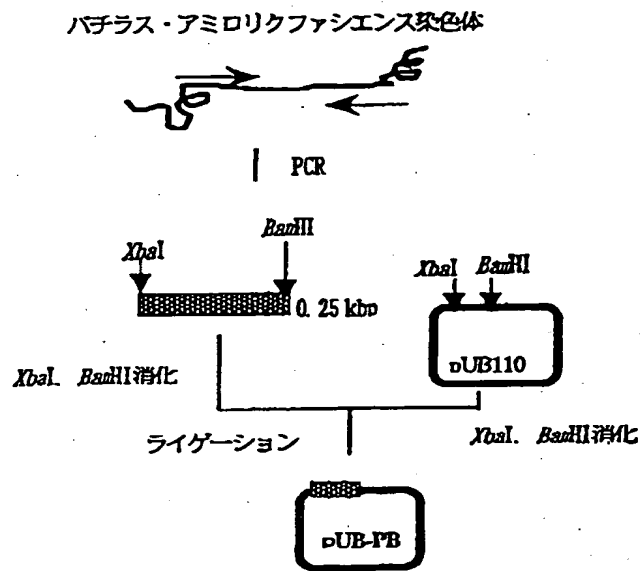
本発明の発現ベクター  $pUB-PBE-TP$  作製の模式図である。

【図 7】

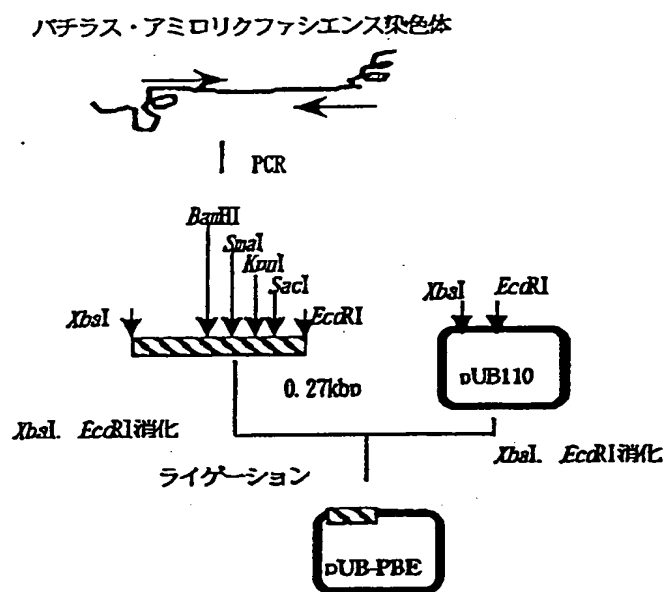
比較例の発現ベクター  $pUB-P-MP$  作製の模式図である。

【書類名】 図面

【図 1】



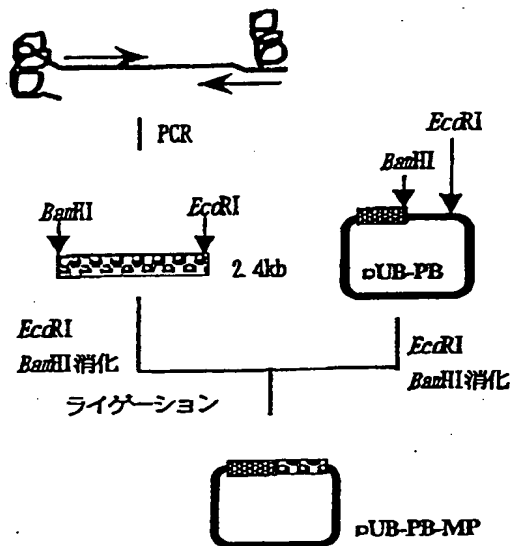
【図 2】





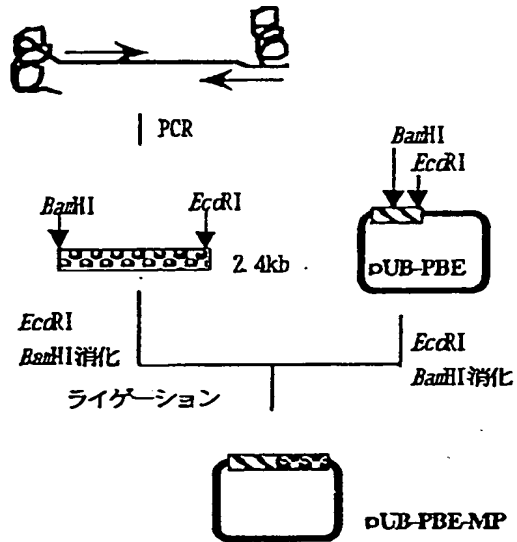
【図 3】

パチラス・スピーシーズ RKI株染色体



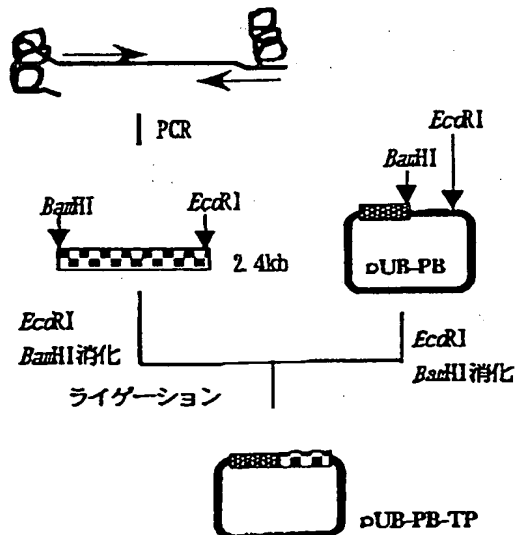
【図 4】

パチラス・スピーシーズ RK1株染色体



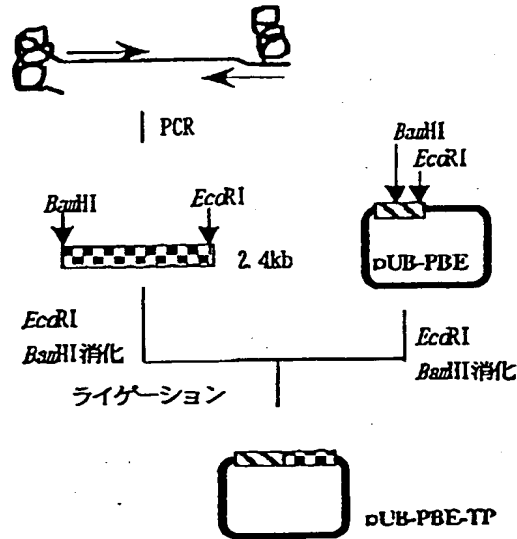
【図 5】

パチラス・スピーシーズ SK1株染色体



【図 6】

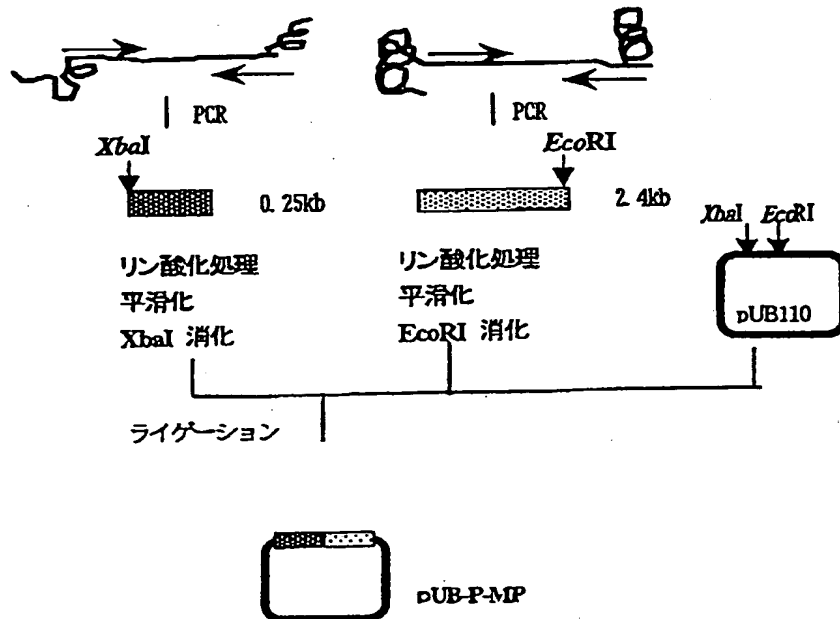
バチラス・スピーシーズ SK1株染色体



【図 7】

バチラス・アミロリクファシエンズ染色体

バチラス・スピーシーズ RK-1株染色体



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 バチルス属の微生物の  $\alpha$  アミラーゼプロモーターよりも活性が高いプロモーターを提供すること。

【解決手段】 バチルス属に属する微生物に由来する  $\alpha$  -アミラーゼのプロモーターの 3' 末端に制限酵素切断部位を 1 又は 2 以上導入する。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000187079]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都千代田区内神田2丁目2番1号

氏名 昭和産業株式会社

